

氏 名(本籍)	やま 山	ざき 崎	かず 和	こ 子
学位の種類	博 士 ( 農 学 )			
学位記番号	農 博 第 8 2 1 号			
学位授与年月日	平 成 17 年 3 月 25 日			
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当			
研究科専攻	農学研究科応用生命科学専攻 (博士課程)			
学位論文題目	<i>Staphylococcus aureus</i> Smith 5R 株における $\gamma$ -hemolysin 産生能の不可逆的欠失機構			
論文審査委員	(主 査)	教 授	神 尾 好 是	
	(副 査)	教 授	西 森 克 彦	
		助教授	米 山 裕	

# 論文内容要旨

## 序論

黄色ブドウ球菌 *Staphylococcus aureus* (以下、*S.aureus*) は自然界に広く存在し、ヒトの常在菌でもある一方で様々な外毒素を産生し日和見感染や食中毒を引き起こす。また畜産業界においてもウシの乳房炎の起因菌として非常に重用視されている。さらに黄色ブドウ球菌は薬剤耐性菌が出現しやすく、中でも *meticillin resistant Staphylococcus aureus* (MRSA) に代表される多剤耐性菌は院内感染の代表例として注目されている。しかしこれら耐性菌も病原因子は通常の株と変わらないことから、感染症の症状を引き起こす病原因子の発現機構を解明し、病原因子及びその活性の発現を抑制することが、将来的には抗生物質に頼らない感染症の治療法の確立につながっていくと考えられ、研究が進められている。

黄色ブドウ球菌の産生する種々の外毒素タンパク質のうち、血球をターゲットとするものとして赤血球を崩壊する  $\alpha$ -、 $\beta$ -、 $\gamma$ -、 $\delta$ - の4種類の hemolysin と白血球崩壊毒素の leukocidin が見いだされており、本研究室ではこれらのうち毒素活性発現に2種類のタンパク質を要求する2成分性血球崩壊毒素である  $\gamma$ -hemolysin と leukocidin について研究が進められている。両毒素は LukF を共通成分とし  $\gamma$ -hemolysin は Hlg 2 とでヒト、ウサギだけでなく種々の動物由来の赤血球を崩壊し、leukocidin は LukS とでヒト及びウサギ白血球を崩壊する。これら2つの毒素タンパク質の構造と機能、作用機作ならびに遺伝子の伝播については多くの成果が得られて来たが、毒素遺伝子の発現調節機構については未だ多くの不明な点が残されたままとなっている。

*S. aureus* Smith 5R 株は、 $\alpha$ -、 $\delta$ -hemolysin 産生量が少なく、 $\gamma$ -hemolysin を高産生する株としてその研究を行うため古くから用いられてきた。しかしながらその一方では、本株を継代して培養していくうちに  $\gamma$ -hemolysin 産生能を失う事が経験的に知られており、 $\gamma$ -hemolysin の精製を目的として本株を大量培養する際には  $O_2$  80%、 $CO_2$  20%の混合ガス通気下という条件で行われている。当研究室でも通常の振とう培養により高い頻度で  $\gamma$ -hemolysin 産生能の低下が観察されていた。そして一度  $\gamma$ -hemolysin 産生能を失った株は混合ガスで培養しても  $\gamma$ -hemolysin 産生株に復帰しないという不可逆性を示した。

本博士論文は、この Smith 5R 株における  $\gamma$ -hemolysin 産生能の不可逆的欠失の機構を解明することを目的とした。そして(1)  $\gamma$ -hemolysin を産生する株、(rough(+)) と産生しない株 (smooth(-))との性状の違いを明らかにし、この発現制御機構が転写レベルの調節によることを明らかにした。(2) Smith 5R 株における  $\gamma$ -hemolysin 産生能の不可逆的な欠失は最近発見された *S. aureus* の病原因子転写制御機構である *sae* に変異が生じたことが原因であることを明らかにし、*sae* が  $\gamma$ -hemolysin の発現を正に制御していることを明らかにした。

## 第1章 $\gamma$ -hemolysin 産生株と非産生株の相違

Smith 5R 株が  $\gamma$ -hemolysin 非産生に変化する原因を明らかにするため、Smith 5R 株を継代培養する事で  $\gamma$ -hemolysin 非産生株を取得し、 $\gamma$ -hemolysin 産生株と性状を比較し相違を明らかにした。

### 1. $\gamma$ -hemolysin 非産生株の出現

#### 1-1. $\gamma$ -hemolysin 産生、非産生のシングルコロニーの形成

研究室にグリセロール保存されている Smith 5R 株  $\gamma$ -hemolysin 産生株 (+ 株) を 2.5% heart infusion broth (以下、HIB) で 37°C、12 時間振とう培養し、培養液を希釈後、1% ヒト赤血球入りの HIB プレート(以下 血球プレート)に植菌しシングルコロニーを得た (Fig. 1)。そのうち溶血斑を形成するコロニーは周縁が rough 型であり、以下 rough(+) とした。一方、溶血斑を形成しないコロニーは周縁が smooth 型であり、このコロニーを形成する株を smooth(-) とした。液体培養において rough(+) は強い凝集を示し、沈降しやすかったが、smooth(-) は凝集せずに分散し、沈降しにくいという違いも見られた。

#### 1-2. 継代培養による rough(+) から smooth(-) への変遷

rough(+), smooth(-) をそれぞれのシングルコロニーから 5 ml の HIB に植菌し、37°C、12 時間振とう培養後、50  $\mu$ l を新たな 5 ml HIB に植え継ぐ (1/100 希釈) という継代培養を 10 回行った。菌の植え継ぎと同時に培養液を希釈して血球プレートに植菌し、シングルコロニーを形成させ、rough(+), smooth(-) の占有率の変遷を追った。その結果、rough(+ )からは例外なく smooth(-) が出現し、継代を重ねるにつれ占有率が著しく増加し、ついにはほぼ 100 % を占めるまでになった (Fig. 2)。一方 smooth (-) から rough(+) が生じることは無かった。

#### 1-3. 見かけの smooth(-) 出現率

rough(+) の純粋培養を 1 時間おきに血球プレートに希釈植菌してシングルコロニーを形成させ、smooth(-) のシングルコロニーが最初に得られるまでの培養時間、世代数を求め、みかけの smooth(-) 株出現率を算出した (Fig. 3)。得られた値は  $2.7 \times 10^{-4}$  という一般に言われる自然変異率  $10^{-8}$  に比べると高いものだった。

#### 1-4. 生育曲線、1 時間あたりの世代数の比較

rough(+), smooth(-) それぞれの生育曲線を作成したところ、対数増殖期の生育に大きな差が見られた (Fig. 4)。rough(+) には約 1 時間の lag phase があり、smooth(-) に比べて遅れて生育していた。さらに 1 時間あたりの世代数を算出したところ、smooth(-) では「0~1 時

間目」から「1~2 時間目」まで最大値(約 2.4 世代/h)を維持し、その後低下するのに対して、rough(+)では「2~3 時間目」でようやく最大値(約 2.3 世代/h)に達し、その後低下した(Fig. 5)。この結果から、rough(+)から smooth(-)が生じた場合、特に rough(+)が対数増殖期に入るまでの間に smooth(-)は素早く増殖するため、継代培養により何度も対数増殖期を経ることで smooth(-)の占有率は著しく増加すると考えられた。

## 2. smooth(-)における多面的な病原因子発現能の欠失

smooth(-)について、LukF、LukS、Hlg2の発現を Western blotting により検出した結果、smooth(-)では LukF、LukS、Hlg2のいずれも検出されなかった(Table 1)。Hlg2、LukS、LukFの各遺伝子、周辺の塩基配列には変異はなかったことから転写以降の過程で発現が抑制されていると推定された。さらに $\alpha$ -hemolysin、表層タンパク質である proteinA、MHC class II analog protein (Map)の発現量も激減し、コアグラーゼ活性も著しい低下を示した。以上の結果から シングルコロニーの形態変化と $\gamma$ -hemolysinを初めとする病原因子の産生には相関性があり、rough(+)から smooth(-)に変化すると、 $\gamma$ -hemolysinだけでなく他の外毒素や、表層タンパク質といった多様な病原因子の発現が抑制されている事が明らかになった。

## 第2章 hlg2、lukFの転写レベルでの発現量の解析

第1章において smooth(-)への変化は転写以降の過程における制御によると考えられたため、本章ではこれが転写レベルにおける制御であることを明らかにし、さらに転写制御因子の探索を行った。

### 1. lukF、hlg2の mRNA の定量

$\gamma$ -hemolysin 各成分のうち、Hlg2は単独の mRNA として、LukFは *lukS-F* のオペロンとして1本の mRNA として転写される。rough(+)から smooth(-)への変化が転写レベルの制御によるものかどうか調べるために *lukF*、*hlg2* 遺伝子をプローブとして、各 mRNA の定量を試みた。smoothの両 mRNA の発現レベルは著しく低く、Northern blotting では検出限界に達しなかった。そこでより精度の高いリアルタイム PCR を用い、Fig. 6A に示すプライマーを用いて逆転写した *hlg2* 及び *lukS-F* cDNA 量を図中のプライマー対により増幅した。内部コントロールとして解糖系の酵素である glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) を用い、相対比を算出した。その結果 *lukF*、*hlg2* mRNA 量はともに smooth(-)では rough(+)のおよそ 1/100 である事が明らかとなり、smooth(-)株における $\gamma$ -hemolysin 産生能の欠失が転写レベルの抑制によるものであることを明らかにした(Fig. 6B, C)。

## 2. 病原因子発現調節因子の検索

### 2-1. rough(+) ゲノムライブラリーの smooth(-) への導入

smooth(-) へ rough(+) のゲノムライブラリーを導入し、 $\gamma$ -hemolysin 産生能が復帰するクローンの取得を試みた。大腸菌とグラム陽性菌のシャトルベクターである pHY 300 PLK をベクターとし、3~5 bp の rough(+) 株ゲノム断片をインサートとする rough(+) 株ゲノムライブラリーを作成した。Smith 5R 株は restriction + であるため、大腸菌から抽出したプラスミドを直接形質転換ができない。そこで大腸菌に発現させたプラスミドをまず restriction +、modification - である *S. aureus* RN 4220 株に導入し、RN 4220 株からプラスミドを精製し、smooth(-) に導入した (Fig. 7)。総計で *S. aureus* ゲノム 2.8 Mbp のおよそ 10 倍にあたる約 30 Mbp 分の rough(+) ゲノム断片を smooth(-) に導入したが  $\gamma$ -hemolysin 産生復帰株は得られなかった。

### 2-2. グローバルレギュレーターが関与する可能性の検討

ライブラリーによる復帰実験と並行して *S. aureus* における主要な病原因子発現のレギュレーター *agr*、*sigB*、*sarA* 等の変異の有無を確認した。このうち *agr* (accessory gene regulator) の塩基配列は rough(+) と smooth(-) で完全に同一であり、*agrA* 遺伝子に IS 1181 が挿入していた (Fig. 8)。さらに rough (+)、smooth(-) とも *agr* 系の RNA III 上にコードされている  $\delta$ -hemolysin の活性が見られないことから Smith 5R 株では *agr* がもともと機能していないと考えられた (Table 2)。そこで *agr* (+) 標準株 (RN 4282 株) の *agr* 領域をインサートとして有する pAG4282 を smooth(-) 株に導入し、*agrA* 相補株を作成した。しかし RNA III 上にコードされる  $\delta$ -hemolysin の発現が確認されたにもかかわらず、 $\gamma$ -hemolysin をはじめ、*agr* により活性化される  $\alpha$ -hemolysin、leukocidin、Map、また逆に *agr* により抑制される protein A、コアグラーゼの発現に影響は見られなかった (Table 2)。一方 rough(+) 株に *agr* を相補した結果、rough(+) よりさらに強く凝集し生育速度が著しく低下し、菌体あたりの  $\gamma$ -hemolysin 産生量も増加するなど *agr* に起因すると思われる影響が見られたことから、rough(+) では正常な *agr* が存在すれば *agr* が機能する潜在能力がある可能性が考えられた。*sigB*、*sarA* システムの塩基配列は rough(+) と smooth(-) で変化は無かった。

### 2-3. *agr* 相補株の *lukF*、*hlg2* の mRNA の定量

rough(+) と smooth(-) の各々の *agr* 相補株についても *lukF* と *hlg2* の mRNA の発現量の定量を行った。その結果 smooth(-) とその *agr* 相補株では差が見られないのに対し、rough(+) *agr* 相補株では rough(+) に比べ両 mRNA 量が 5~10 倍程度増加していた (Fig. 9A, B)。この結果は Smith 5R 株では *agrA* が機能していないが、rough (+) では潜在的に *agr* による制御

が機能する経路が維持されているため、正常な *agr* の相補により Hlg/Luk の発現が上昇したのに対し、smooth (-)株ではその経路が維持されていないために *agr* を相補しても効果がないことが明らかになった。これより smooth (-)株では ① *agr* による制御と ② Smith 5R 株で本来機能していると予測される *agr* とは独立の制御系とで共通に働いている調節因子が関与していると考えられた (Fig. 10)。

### 第3章 $\gamma$ -hemolysin 発現制御因子の同定

第2章の結果から Smith 5R 株の  $\gamma$ -hemolysin の発現制御因子について検討した結果、*sae* が関与している可能性が示唆された。本章では smooth(-) では例外無く *sae* に変異が生じていることを明らかにし、*sae* により  $\gamma$ -hemolysin の発現が正の制御を受けていることを明らかにした。

#### *sae* が関与する可能性の検討

近年 *S. aureus* の病原因子の転写調節因子として *sae* (*S. aureus* exoprotein expression) 系の研究が進んできた。*sae* ローカスにある4つの遺伝子のうち *saeP* と *saeQ* の機能は未だ明らかにされていないが、*saeS* がセンサーとして働き、*saeR* がレスポンスレギュレーターとしてターゲット遺伝子のプロモーター部位に特異的に結合する事で転写を調節している典型的な2成分性制御システムであると推定されている (Fig. 11A, B)。さらに *sae* は *agr* とは独立に病原因子の発現を活性化するが、*agr* と協調することでより強く活性化しているという報告がある。第2章で示したように Smith 5R 株においては *agr* が機能していないにも関わらず rough(+) が病原因子を産生しており、また *agr* の相補によって  $\gamma$ -hemolysin の発現量が増加することから rough(+) の  $\gamma$ -hemolysin 発現には *sae* が関与していると推定した。そして smooth(-) では *sae* の機能が失われていると考えられた (Fig. 10)。

#### 1-1. smooth(-) 型コロニーの *sae* の塩基配列

rough(+), smooth(-) 各々の *sae* の全塩基配列約 3100 bp を決定し、比較した。その結果 smooth(-) では *saeR* の 404 塩基目の T が G グアニンに変異したことで終止コドン TGA に変わっている事が明らかになった (Fig. 12)。さらに smooth(-) 型コロニーのうち、ランダムに42個を選び *sae* の塩基配列を決定した結果、すべてのコロニーにおいて、*saeQ* から *saeS* の領域に何らかの変異が生じていた (Fig. 13)。変異パターンは1塩基変異から、IS、トランスポゾンの挿入、配列の欠失などと多様であり法則性は見られなかった。ナンセンス変異でないものも例外なくコードされるアミノ酸が変わっていたことから、これらの変異はランダムに生じたものであるが変異の結果 *sae* の機能に何らかの障害をきたしているために  $\gamma$ -

hemolysin などの病原因子を発現しなくなっていると考えられた。単一の rough(+) シングルコロニーから継代培養を始めた場合には全く同じ変異の生じている smooth(-) コロニーが多く得られ、多様な変異株はそれぞれ独立した rough(+) コロニーからの継代培養により取得された。実際に単一の rough(+) シングルコロニーから継代培養した場合、ランダムに選択した 18 個の smooth(-) 型コロニーでは全く同じ変異型が 12 個、4 個、2 個ずつ生じていた。これは rough(+) のシングルコロニー内にすでにいくつかの smooth(-) 型変異株が存在しており、早い時期に生じた smooth(-) 型変異ほど継代培養において優先的に増殖し、培養中で占める割合が高くなっているためと考えられた (Fig. 14.)。

## 1-2. smooth(-) 株の *sae* 相補株の性状

*sae* 系が  $\gamma$ -hemolysin 産生と関与していることを確かめるために smooth (-) の *sae* 相補株の作成を試みた。*agr* と同様に pHY 300 PLK ベクターに rough(+) 由来の *sae* 全領域を PCR 増幅して挿入し pSAE5R を得た。*E. coli* DH 5  $\alpha$  株に導入しシークエンスを確認したところ、得られたプラスミド中の *sae* には例外なくランダムに変異が生じていた。この結果は正常な *sae* 領域をクローン化した大腸菌が生育できない可能性が高いことを示している。第 2 章 2-1 で *sae* 相補株を得られなかった理由として、大腸菌で作製した rough(+) ゲノムライブラリーには正常に機能する *sae* を持つクローンが存在しなかった可能性を示している。そこで pSAE5R を大腸菌、*S. aureus* RN4220 株をへて smooth(-) に導入し、血球プレート上で溶血斑を形成するクローンを得た。このプラスミド中の *sae* は *saeS* の C 末端近傍の 1118 塩基目の A が G に変異していた (pSAE5R (*saeS* A1118G)) (Fig. 15)。pSAE5R (*saeS* A1118G) を導入した smooth(-) では  $\gamma$ -hemolysin 産生が復帰し (Fig.16)、さらに  $\alpha$ -hemolysin、leucocidin、protein A、コアグラーゼ、Map という rough(+) で発現していた病原因子の発現も復帰する事を確認した。しかしシングルコロニーの形は rough には戻らなかった。以上の結果、*sae* という一つの遺伝子を相補したことで  $\gamma$ -hemolysin の発現が復帰したことから  $\gamma$ -hemolysin の発現が復帰したことから  $\gamma$ -hemolysin の発現が *sae* により正の制御を受けていることを明らかにした。

## 総括

- 1) Smith 5R 株の  $\gamma$ -hemolysin 産生型から非産生株が派生し、 $\gamma$ -hemolysin 産生能を失うと同時にコロニーの形態が rough から smooth に変化した。smooth(-) は生育が早いために継代培養することで rough (+) から smooth(-) に変遷した。

- 2) smooth(-) において  $\gamma$ -hemolysin、leukocidin の発現制御は転写レベルでの調節に起因していた。
- 3) Smith 5R 株の rough(+) では *agr* が機能していなくても、 $\gamma$ -hemolysin を発現していることが明らかになった。
- 4) smooth(-) では例外なく *sae* に変異が生じていることを明らかにし、*sae* を相補することで  $\gamma$ -hemolysin、leukocidin の産生能が復帰したことから *sae* が  $\gamma$ -hemolysin、leukocidin の発現を正に制御していることを明らかにした。

## 原著論文

Yamazaki, K., F., Kato, and Y., Kamio, J., Kaneko, Expression of  $\gamma$ -hemolysin is regulated by *sae* in *Staphylococcus aureus* strain Smith 5R, submitted.

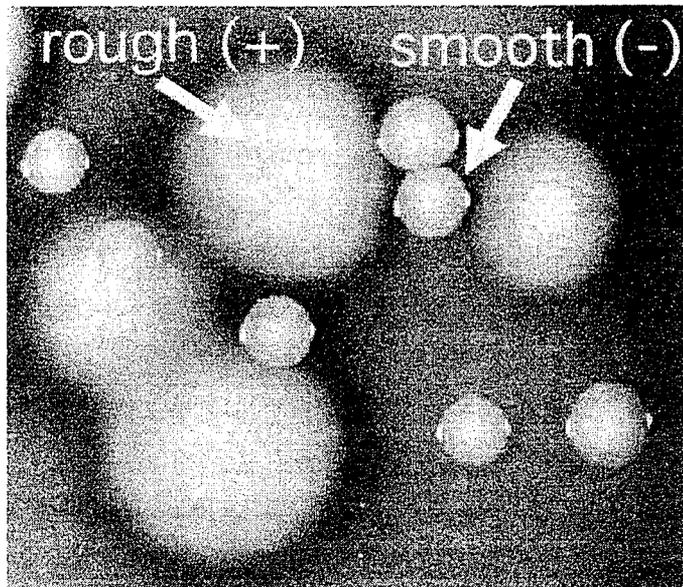


Fig. 1. ヒト赤血球プレートにおいてSmith 5R 株が形成する 2 種類のシングルコロニー周縁が rough 型で溶血プラークを形成するコロニーを rough(+), smooth 型で溶血プラークを形成しないコロニーを smooth 型とした。

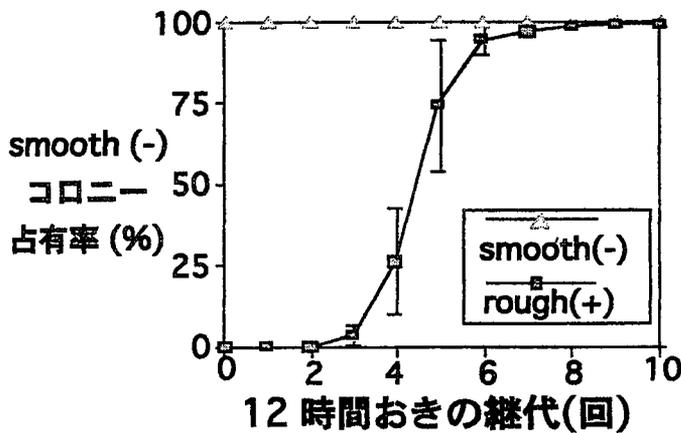


Fig. 2. 継代培養 rough (+), smooth(-) について12時間おきに菌を植え継ぎ、同時にヒト赤血球プレートに希釈して植菌し、シングルコロニーを形成させ、各コロニーの占有率を示した。rough(+)  
を  $\square$ 、smooth(-) を  $\triangle$  で示した。

変異株出現率  $P = 1 - \sqrt[n]{1-X}$   
 $n$ ; 世代数 6.54 (10 時間後)  
 $X$ ; smooth (-) の出現頻度 1/563

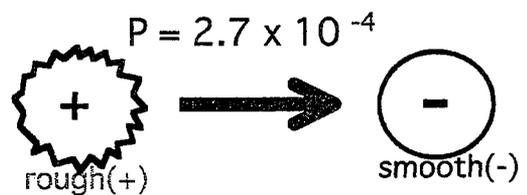


Fig. 3. 見かけの smooth(-) コロニー出現率

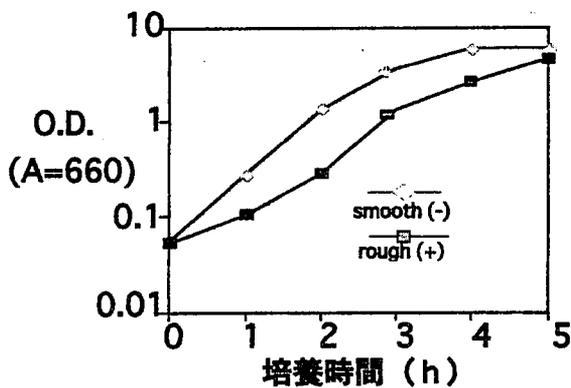


Fig. 4. 生育曲線 (対数増殖期) 対数増殖期の生育曲線を rough(+)  
を  $\square$ 、smooth(-) を  $\diamond$  で示した。

◆1時間あたりの世代数  
 $= \frac{\log N_t - \log N_{t-1}}{\log 2}$   
 $N_t$ ; t 時間後の総菌体数  
 $N_{t-1}$ ; t-1 時間後の総菌体数

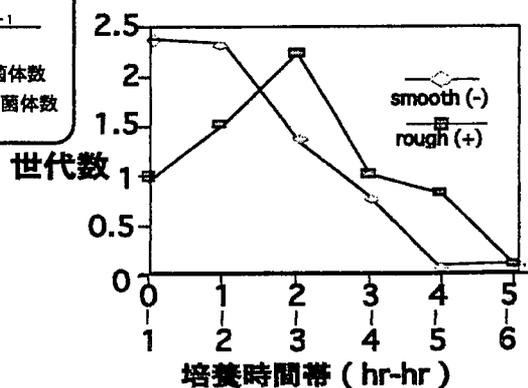


Fig. 5. 1 時間あたりの世代数 図中に示した式より1 時間あたりの世代数を算出した。rough(+)  
を  $\square$ 、smooth(-) を  $\diamond$  で示した。

	rough(+)	smooth(-)
LukF	+	-
Hlg2	+	-
LukS	+	-
$\alpha$ -toxin	+	±
ヒト赤血球の溶血	+	-
protein A	++	±
Map	++	-
コアグラーゼ活性	++	±
コロニーの形態	rough	smooth
凝集 (対数増殖期)	++	-

Table 1. rough(+) と smooth(-) の病原因子の発現、菌の特徴の相違

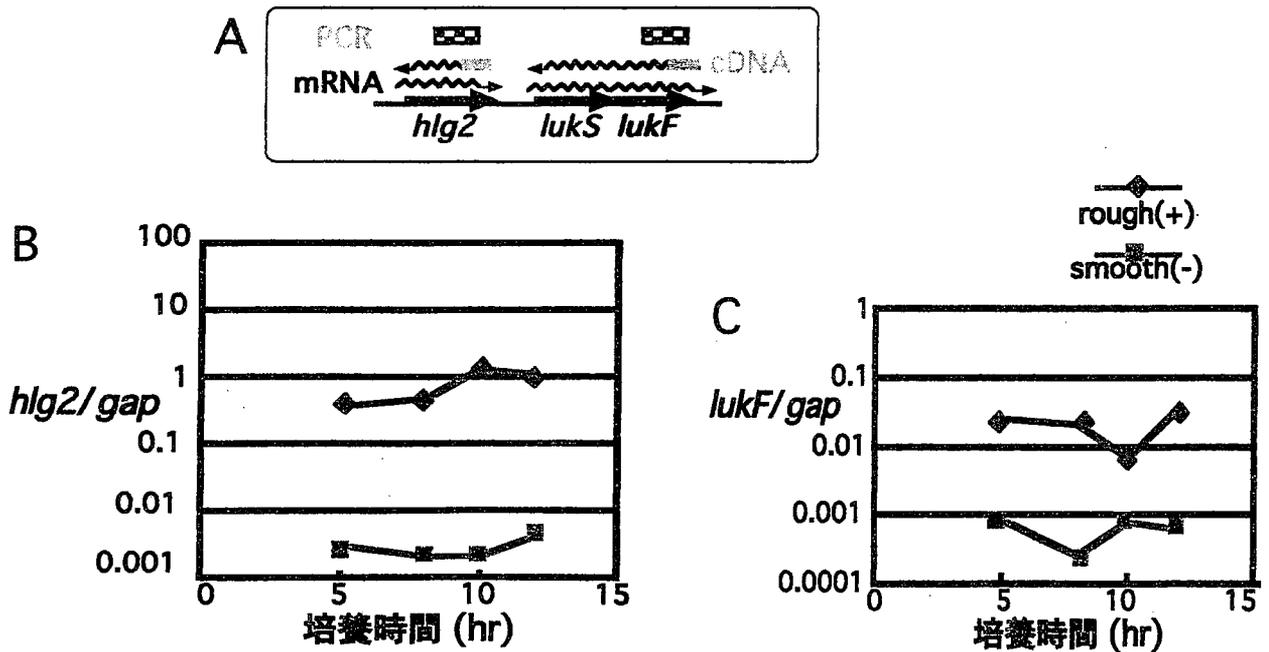


Fig. 6. Hlg/Luk の遺伝子構造 (A)とリアルタイムPCRによる  $hlg2$  (B)、 $lukF$  (C) mRNA の定量 (1) A 逆転写反応に用いたプライマーを  $\blacksquare$  で、PCR 増幅断片の位置を  $\blacksquare$  で示した。B と C はそれぞれ  $hlg2$ 、 $lukF$  の mRNA 発現量の定量を行った。内部コントロールである  $gap$  の mRNA 発現量に対する相対値を示した。rough(+)を ◆、smooth(-)を ■ で示した。



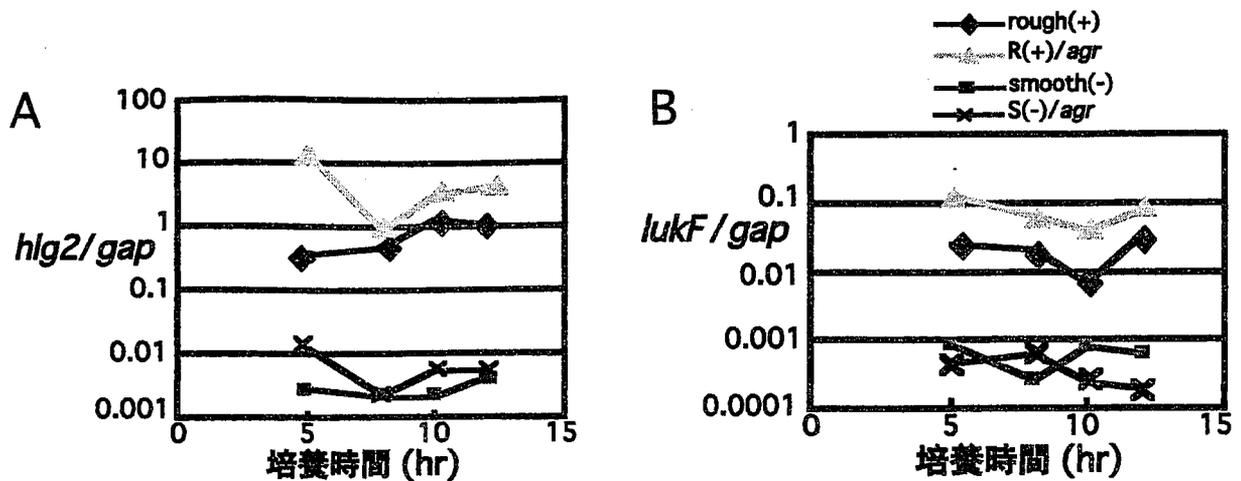


Fig. 9. リアルタイムPCRによる *hlg2* (A)、*lukF* (B)mRNA の定量 (2) Fig. 6. と同様に rough(+), smooth(-) 各々の *agr* 相補株について A は *hlg2*, B は *lukF* の mRNA 発現量の定量の結果を示した。rough(+)  
を ◆、smooth(-)を ■、rough(+)*agr* 相補株 R(+)/*agr* を ▲、smooth(-)*agr* 相補株 S(-)/*agr* を ×  
で示した。

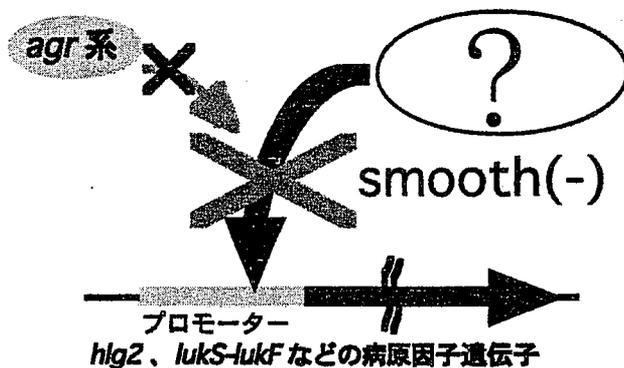


Fig. 10. smooth(-) における  $\gamma$ -hemolysin 産生能の欠失の原因と考えられる制御系のモデル図 *agr* 系を欠く Smith 5R 株 rough(+)  
では、*agr* を介さない制御系 (?で示した) が働いている。smooth(-) ではその制御系に変異が起こったため、 $\gamma$ -hemolysin 産生能が失われた。

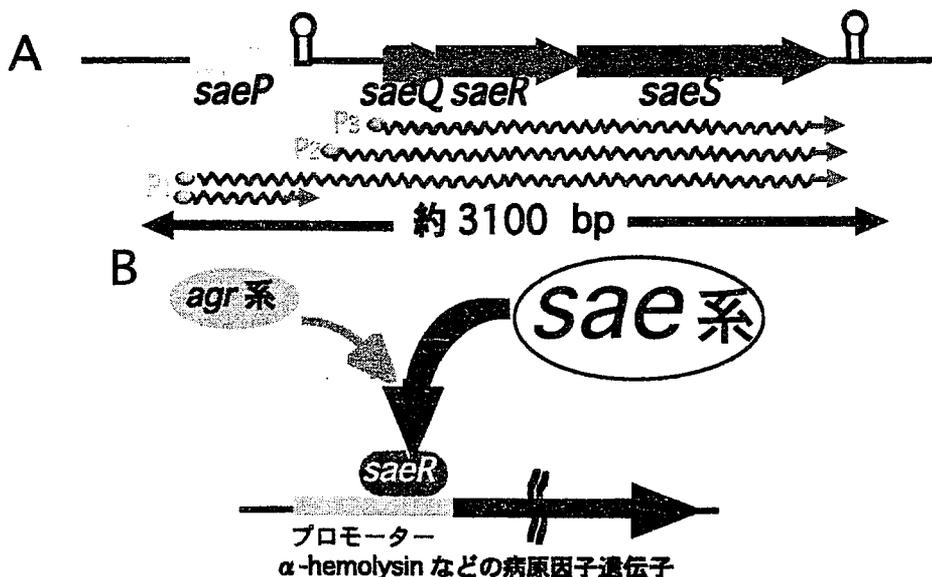


Fig. 11. *sae* の構造と病原因子の転写制御機構 A は *sae* の *saeP*~*S* 遺伝子の構造と転写単位を示した。2成分性制御系は R と S からなる。B は *sae* の転写制御機構と *sae*-*agr* の協調性を示した。*sae* は *agr* に非依存的に病原因子の転写を活性化するが、*agr* と協調することでより強く活性化する。

1 CCTCCCCNNNTATTTTACTCCTATTTTAAATCAGACAATTATTTTCATTTTCAAATTATTTCTTTCTTCAATATTAGTCAAGCGATATTTAAACGAA 100  
101 GTTAAAGAATTAGTTAATGGCATAATTATTTGCCTTCATTTTAAACTTAACCTATCAAATTTGAAGAAATGAGGAGTTAGCATGAATACAAAATATTTTGTAG 200  
M N T K Y F L A  
201 CAGCTGGTGCTGTTATCACAACATTAGCTTTAGGTGCTTGGGTAATTTCTAATTCACAAGATCAAGGTAACAAAACCTGAACAAAAACAAAGTCAGAAGA 300  
A G A V I T T L A L G A C G N S N S Q D Q G N K T E Q K T K S E D  
301 TAGCAATGTTAAACTGATAAAAACAAACACCTAACAGGTACATTCAGTTCTAAAAACGGTGAAGCTGTTGAAGGTAAAGCTGAGATTAATAATGTTAAA 400  
S N V K T D K T K R L T G T F S S K N G E T V E G K A E I K N G K  
401 TTAATGCTTACTAATAACAATCATCAAAGGTCAGATTTATACGCTACCTAACAAAAATGGCGACATTAATAAACGGTAAAGAAATCGCAATGGTTG 500  
L M L T N Y K S S K G P D L Y V Y L T K N G D I K N G K E I A M V D  
501 ACTACGATAAAGAAAAACAACATTTGATCTTAAAAATGATAGTTTAAAGCAAATATGATGAAGTAAACAATCTATTGTAATAAACGCTCACGTCATCTCGG 600  
Y D K E K Q T F D L K N V D L S K Y D E V T I Y C K K A H V I F G  
601 CGGCGCTAAATTAATAATCAATTTCTGAGTTAAACTTTTATTACAACATACTATTACTATACATTACAAAATTTTAAAAATACATTACACTCAITTA 700  
G A K L K \*  
701 CTCAATGGAAGCGTATGATTTTACAGCCCCCTAGCTTGTAGAAATCATACTTTCTTTTTTCAATATATATACAACATTAATAATCCCATAAAGATTGCA 800  
801 GAGCACATAAGTAAATTTTTAGAGCTTGAAGTGTGTTAGCTTAAGCAACCCATGAGCTCAAACACTTCTGTTCACATAACACTACAAATCGCATT 900  
901 TGTGTCTAATCTTATGTTTATATAAATACACACAATAAATAGAAAGAAATGTGAACATCATGAATAAATTTTGTACTCGTTACATTTATCATTCTGTG 1000  
1001 TGGGTTCAAGTATTGTTATGTTAATGCAAGGCTACGAAAAATTAACGGCGGATTTACGCTGAAAGGTTTAGTACCAGTCATCGCTAACAACTACTGATTC 1100  
1101 ACCAGAGTGGTATAAGTGGTTTTTCGCAAAATATAGTTGCACATACGACGTCATTATTTGATATTGTTGCTCCACTCGGAGAGATTGCAATTTGGATTAGGT 1200  
1201 TTAATTTTTGGAGTTTTTGCATATGCTGCTAGTTCTTTGGAGCCCTTTGTTATGATAAATATATCTTAGCAGATATGATTTTACGTATCCTCTTCAAT 1300  
M I N Y I L A D M I F T Y P L Q L  
1301 TAACCTTTCTTATCCTTTTACTAATGAGTCACTCATTTGTTAAAAACAGATTTCACTTAAAGAAATCATTAAATTTACTTTAGAGGTGTAAGAACAGAGGTTGA 1400  
T F F I L L L M S H S L L K Q I S L K E I I N Y F R G R K N R G E  
1401 AAAAAATAGATGACCCACTTACTGATCGTGGATGATGAACAAGCATTGTAGACATTTGTCAAACCTATTTTGAATATGAAGGTTACAAGTAACAACGAC 1500  
K I D D P L T D R G \*  
M T H L L I V D D E Q D I V D I C Q T Y F E Y E G Y K V T T T  
1501 AACTAGCGTAAAGAAAGCAATTTCTTACTATCAAAATGATATTGATATCATGGTACTTGTATATCATGATGCCAGAAGTTAATGGTTACGACATTGTCAAAA 1600  
T S G K E A I S L L S N D I D I M V L D I M M P E V N G Y D I V K  
1601 GAAATGAAAGGCAAAAATAGATATCCCTTTATCTATTTAACTGCCAAAAACACAAGAACATGATACCATTTACGCCCTTAACTTTAGGTGCAGATGACT 1700  
E M K R Q K L D I P F I Y L T A K T Q E H D T I Y A L T L G A D D Y  
1701 ATGTCAAAAAACCATTTAGTCCAAGGGAACCTGTTTTACGTATTAATAATTTACTTACAAGAAATGAAGAAATACCATCATCAACAGTTGAACAACCTGTC 1800  
V K K P F S P R E L V L R I N N L L T R M K K Y H H Q P V E Q L S  
TGA  
1801 GTTTGATGAATTAACACTTATTAACCTAAGTAAAGTTGTGACTGTAATGGTCACGAAGTCCCTATGCGTATTAAGGAATTTGAGTTATTGTGGTATTTA 1900  
F D E L T L I N L S K V V T V N G H E V P M R I K E F E L L W Y L  
\*  
1901 GCTTCTAGAGAAAATGAAGTTATTTCTAAATCAGAATTACTTGA AAAAGTTGGGATATGACTATTACGAAGATGCTAATACCGTGAATGTCCATATAC 2000  
A S R E N E V I S K S E L L E K V W G Y D Y Y E D A N T V N V H I H  
2001 ACCGTATTAGAGAAAAATAGAAAAAGAGAGCTTTACAACATATACCATCACAACCTGTATGGGGATTAGGATATAAATTTGAAAGGAGCCGATAATGGTG 2100  
R I R E K L E K E S F T T Y T I T T V W G L G Y K F E R S R \*  
M V  
2101 TTATCAATTAGAAGTCAAATCATTATTGGCGTCGATCGAGTACTATTAACCTCAACTATTTTAGCAATTGCATATATTTAATGTGGTTTAAACGGCC 2200  
L S I R S Q I I I G V V S S I L L T S T I L A I A Y I L M W F N G H  
2201 ATATGACACTAATTTGACCTAACGACAATAATTACAAGCTTTTTAACCTTATTAATATGTAGTATTTTATTAATCCACTTATACAAAAAATTAAGCA 2300  
M T L T L T L T T I I T S F L T L L I C S I F I N P L I Q K I K Q  
2301 GTTTAATATAAAAATGAAGCAATTTGCTAACGGAAATACGCAAGCAATGATAAAACGTTTAAATTCACAAAAGAAATTTATGAATTAATCAATCTTTT 2400  
F N I K T K Q F A N G N Y A S N D K T F N S P K E I Y E L N Q S F  
2401 AATAAAATGGCTTCTGAAATTCGCAACAATGAATCAAATTAATCCGAACAACGAAAGAAACGAAACTGATTCAAAACCTAGCCCTGATTTAAAAA 2400  
N K M A S E I T Q Q M N Q I K S E Q Q E K T E L I Q N L A H D L K T  
2501 CACCTTTAGCAAGCAITATTTATATTCTGAAGGACTACGTGATGTTAATCACTAAGGATCATGAGATTAAGAGTCATACGACATTAATTAACA 2500  
P L A S I I S Y S E G L R D G I I T K D H E I K E S Y D I L I K Q  
2601 AGCAAAACAGATTATCAACATTTTGTGATGATGACTCATATTATCACTTTAAATACAGGTA AAAACATATCCCCAGAAATTAATACAACCTAGACCAATTA 2700  
A N R L S T L F D D M T H I I T L N T G K T Y P P E L I Q L D Q L  
2701 CTTGTATCAATATTGCAACCATATGAGCAACGTATCAAAACATGAAAACCGCACATTAGAAGTGAATTTCTGTAACGAAATTTGATGCAATTTTATCAATATC 2800  
L V S I L Q P Y E Q R I K H E N R T L E V N F C N E I D A F Y Q Y R  
2801 GAACGCCACTTGAGCGTATTTTAAACAACTTACTTGATAATGCGCTAAAATTTTCAAATGTTGGTAGTCGCATTGATATTAATATTAGTAAAAACGAAGA 2900  
T P L E R I L T N L L D N A L K F S N V G S R I D I N I S E N E D  
2901 TCAAGATACTATCGACATTTGCTATTAGCGATGAAGGATTTGGCATTATACCAGAACTACAAGAACATATATTGAAACGTCATTCAGAGTAGAAAACTCT 3000  
Q D T I D I A I S D E G I G I I P E L Q E H I F E R T F R V E N S  
3001 CGTAATACAAAAACGGTGGTTCTGGATTAGGCTTATATATAGCTAATGAACCTCGCGCAACAAAAATACGCAAAAAATCAGTGAAGCAGTGATATAGATG 3100  
R N T K T G G S G L G L Y I A N E L A Q Q N N A K I S V S S D I D V  
3101 TAGGAACACTGATGACTGTAACATTTACACAATTAAGACATTACGTCATAATCCGATTTATTTATAAAAAA  
G T T M T V T L H K L D I T S \*

saeP

saeQ

saeR

saeS

Fig. 12 rough(+) と smooth(-) の sae 領域の全塩基配列の比較 rough(+)  
の sae の塩基配列、アミノ酸配列をグレーで示し、smooth(-)で変異していたコドンとコードされるアミノ酸を黒で示した。

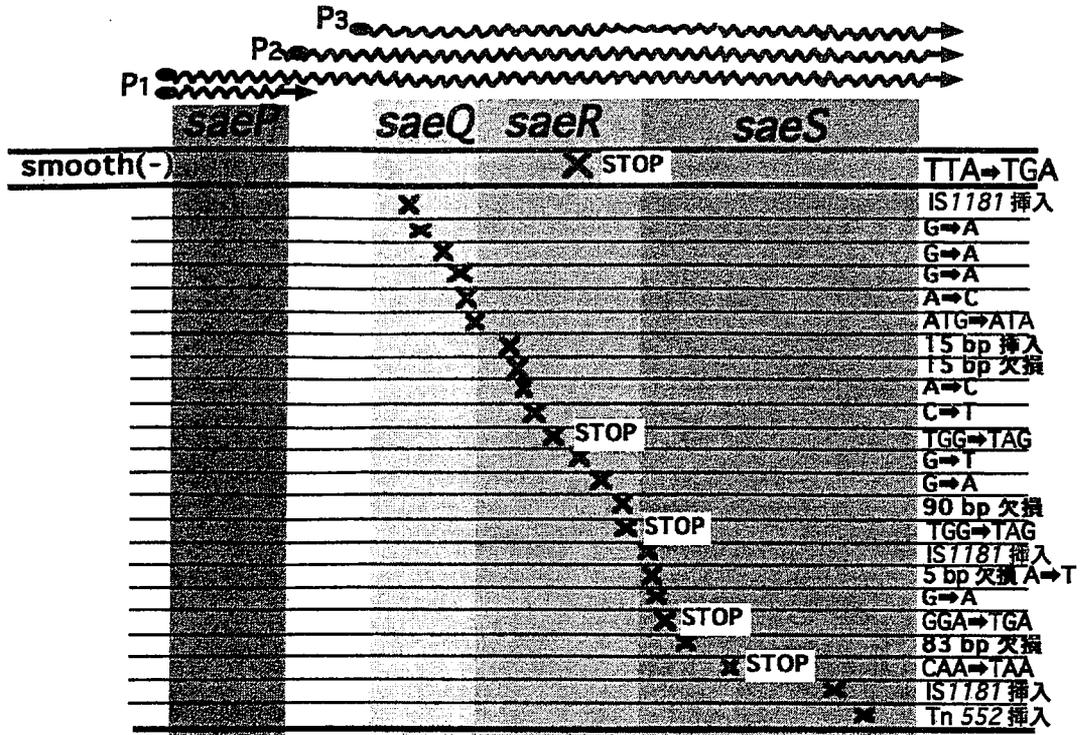


Fig. 13. ランダムに選択した smooth(-) コロニーの sae 領域に生じた変異箇所の分布と変異パターン ランダムに選択した 42 個の smooth(-) コロニーの sae 領域の全塩基配列を決定した。X は変異及び IS、トランスポソンの挿入部位を示す。

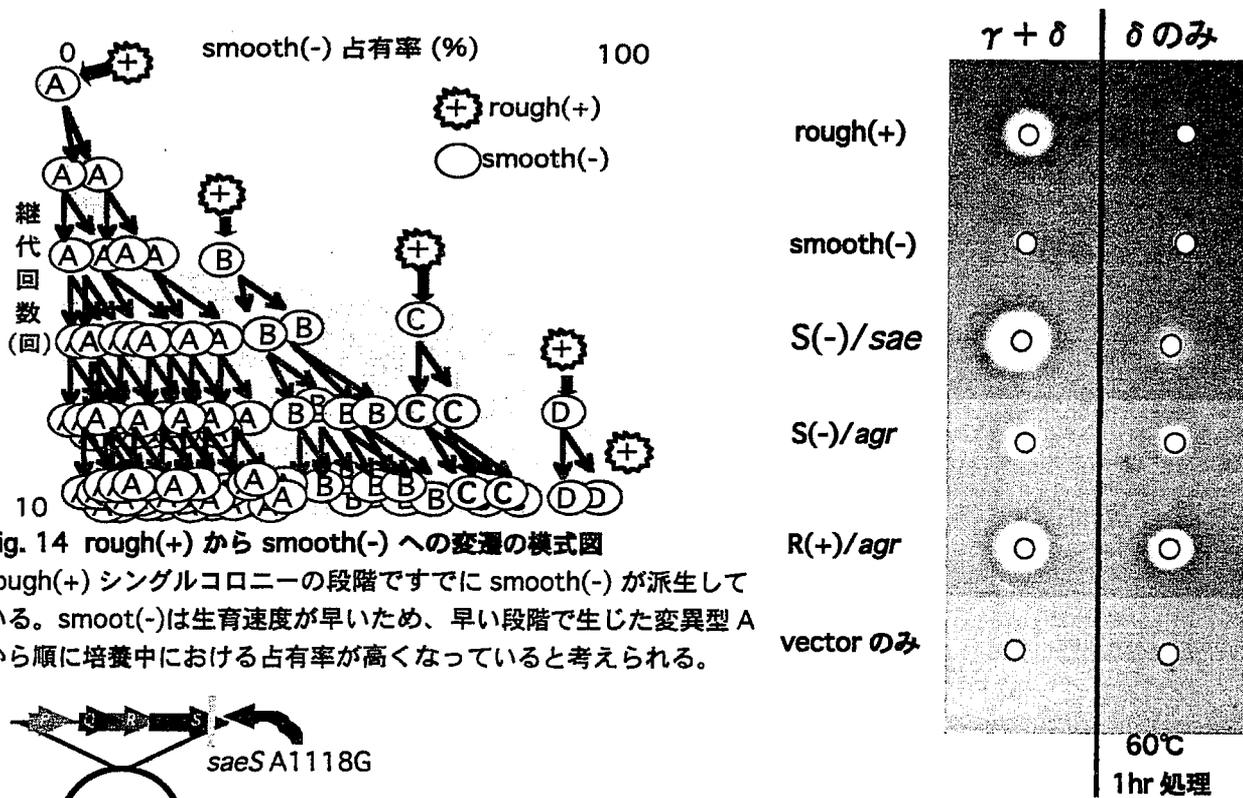


Fig. 14 rough(+) から smooth(-) への変遷の様式図 rough(+) シングルコロニーの段階ですでに smooth(-) が派生している。smooth(-) は生育速度が早いため、早い段階で生じた変異型 A から順に培養中における占有率が高くなっていると考えられる。

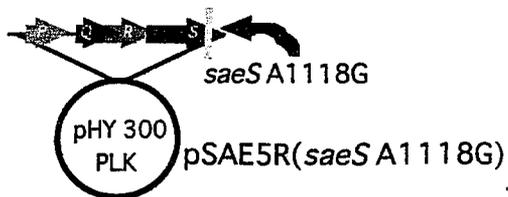


Fig. 15 sae 相補プラスミド saeS の 1118 塩基目の A が G に変異した saeS A1118 G をインサートとした pSAE5R(saeS A1118G) を smooth(-) に導入した。

Fig. 16. smooth(-) sae 相補株における  $\gamma$ -hemolysin 産生の復帰 smooth(-) sae 相補株を S(-)/sae と示した。各株を 12 時間時間培養し、培養上清の溶血活性を比較した。右列は熱処理により  $\gamma$ -hemolysin を失活させ、 $\delta$ -hemolysin 活性を見た。PBS ヒト赤血球プレートに直径 5mm のウェル(○)を開け、培養上清 30  $\mu$ l を入れ、37°C で 24 時間反応を行った。

## 論文審査結果要旨

黄色ブドウ球菌 *Staphylococcus aureus* (以下, *S.aureus*) は, ヒトの常在菌である一方, 様々な外毒素を産生し日和見感染や食中毒を引き起こす。また近年畜産業界においてウシの乳房炎の起因菌として重要視されている。*S.aureus* は薬剤耐性菌が出現しやすく, 近年 MRSA (methicillin resistant *Staphylococcus aureus*) などによる院内感染や, 市中獲得型 MRSA (CA-MRSA) による新興感染症が問題化しており, 抗生物質が「魔法の弾丸」とは言えない時代になった。

当研究室では *S.aureus* の産生する外毒素である 2 種類の 2 成分性溶血毒素  $\gamma$ -hemolysin と leukocidin の研究が進められており, これまでに両毒素の作用メカニズムに関する多くの知見が得られている。 $\gamma$ -hemolysin は LukF と Hlg2 とでヒトを初めとする種々の動物由来の赤血球を崩壊し, leukocidin は LukF と LukS とで, ヒト及びウサギ白血球を崩壊する。しかしこれら毒素の発現調節機構に関する研究は殆ど成されていない。*S.aureus* Smith 5R 株 (以下, Smith 5R 株) は,  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\delta$ -hemolysin の産生量が少なく  $\gamma$ -hemolysin を高産生する株であり, 古くから  $\gamma$ -hemolysin の研究に用いられてきたが, 一方では本株を継代して培養していくうちに  $\gamma$ -hemolysin 産生能を失う事が知られていた。 $\gamma$ -hemolysin の精製を目的として本株を培養する際には  $O_2 : CO_2 = 80 : 20$  の混合ガス通気下で培養を行なっているが, 通常の振とう培養で継代培養することにより, 高い頻度で  $\gamma$ -hemolysin 産生能が低下する。そして一度  $\gamma$ -hemolysin を産生しなくなった株は混合ガス通気下で培養しても  $\gamma$ -hemolysin 産生能は戻らないという不可逆性を示す。

本博士論文は, この Smith 5R 株における  $\gamma$ -hemolysin 産生能の不可逆的欠失機構を解明し,  $\gamma$ -hemolysin の発現制御機構を解明することを目的とした。そしてまず, (1) Smith 5R 株の培養液から  $\gamma$ -hemolysin を産生する株, (rough (+)) と産生しない株 (smooth (-)) を分離し, Smooth (-) では  $\gamma$ -hemolysin だけでなく, leukocidin を初めとし,  $\alpha$ -hemolysin などの外毒素や表層タンパク質といった多様な病原因子の発現も抑制されるという多面的な制御を受けていることを明らかにした。また継代培養により rough (+) から smooth (-) が例外無く高頻度で派生すること, smooth (-) の生育速度が rough (+) よりも早いために継代を重ねるにつれ, smooth (-) の占有率が著しく高くなることを明らかにして,  $\gamma$ -hemolysin 産生能が減少する過程を解明した。さらに rough (+) から smooth (-) への変化の遺伝子レベルでの解明に向け, (2) 大腸菌で構築したプラスミドを restriction-, modification+ である *S.aureus* RN4220 株を介すことにより, *S.aureus* の種々の発現制御遺伝子を smooth (-) に導入する形質転換系を確立した。それを用いて, (3) Smith 5R 株では *S.aureus* の主要なグローバルレギュレーターである agr (accessory gene regulator) がもともと機能していないこと明らかにし, smooth (-) への変化が agr とは独立した, 転写レベルでの発現制御によるものであることを明らかにした。そして (4) Smith 5R 株における  $\gamma$ -hemolysin 産生能の不可逆的な欠失は *S.aureus* の病原因子発現制御機構の一つである sae (*S.aureus* exoprotein expression) に 1 塩基変異や IS, トランスポゾンの挿入などによるランダムな変異が生じ, sae の構成タンパク質の 1 次構造が変化したことで sae の機能に障害をきたし,  $\gamma$ -hemolysin / leukocidin 遺伝子が転写されなかったことが原因であることを明らかにした。

以上のように, 本研究は, *S.aureus* Smith 5R 株における  $\gamma$ -hemolysin 産生能の不可逆的欠失機構の解明を通じ, sae が  $\gamma$ -hemolysin / leukocidin の発現を正に制御していることを明らかにしたもので, 本審査員一同は, 本研究者に博士 (農学) の学位を授与するのに値するものと認定した。